



世界的细胞培养工厂
The World Cell Factory

细胞复苏、传代与冻存操作流程

一、仪器与试剂

仪器	试剂	耗材
离心机	胎牛血清（FBS）	离心管（15ml、50ml）
生物安全柜	无菌 1×PBS pH=7.2	T-25 细胞培养瓶
电动移液器	0.25%胰蛋白酶+0.02%EDTA	一次性无菌移液管（2ml、5ml、10ml）
CO ₂ 培养箱	完全培养基（含血清）	1.8ml 冻存管
倒置显微镜	冻存液：90%FBS+10%DMSO	程序降温盒
液氮罐	异丙醇	
恒温水浴锅		
超低温冰箱		

二、操作流程：

复苏

- 1) 将恒温水浴锅中的水预热到 37℃；
- 2) 从液氮罐中取出要复苏的细胞，尽快转入恒温水浴锅中复温，不断震荡冻存管以提高复温速率；
- 3) 将融化了的冻存管中的用移液管转入一直装有 5ml 完全培养基的 15ml 离心管中，充分混匀后，300g 离心 5min；
- 4) 离心完成后弃去上清，用 1ml 完全培养基重悬细胞后，转入 T-25 细胞培养中，再加完全培养基 4ml，之后转入 CO₂ 培养箱中培养静置。

传代

- 1) 将需要那传代的细胞从 CO₂ 培养箱中取出，在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基；
- 2) 向培养内加入无菌 1×PBS 3ml，之后水平放置培养瓶，旋转震荡培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养平面上所都的面积，吸弃 PBS；
- 3) 重复步骤 2 一次，之后向瓶内加入消化液 2ml，轻微震荡后放入 37℃ CO₂ 培养箱中孵育 1min；
- 4) 孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，如还有部分细胞未消化下来，可在生物安全柜内用移液管吸起消化液，吹打培养平面；
- 5) 向消化下细胞的培养瓶中加入 3ml 完全培养基终止消化，然后将培养瓶中的液体转入 15ml 离心管中，300g 离心 5min；
- 6) 离心完成后，弃上清，用 2ml 完全培养基重悬细胞，将重悬后的培养基转入 2 个 T-25 培养瓶，每个培养瓶各 1ml，提前向每个培养瓶中各加入 4ml 完全培养基；
- 7) 水平放置培养瓶，旋转震荡培养瓶，使细胞均匀分部在培养平面上，然后将培养瓶置于 CO₂ 培养箱中静置培养。

注意：

- a) 每次消化不超过 2min，如果消化 2min 后，培养瓶中还有较多细胞贴壁，可采用分步消化，将消化下来的细胞移入 15mL 离心管中和，再向培养瓶中加入胰酶继续消化，每次消化不超过 2min，直到完全消化下来为止。
- b) 细胞传代建议 1 传 2。

冻存

- 1) 将需要那冻存的细胞从 CO₂ 培养箱中取出，在生物安全柜内，打开培养瓶瓶口，吸弃瓶内的培养基；
- 2) 向培养内加入无菌 1×PBS 3ml，之后水平放置培养瓶，旋转震荡培养瓶，使 PBS 能够浸润到培养平面上所都的面积，吸弃 PBS；
- 3) 重复步骤 2 一次，之后向瓶内加入消化液 2ml，轻微震荡后放入 37℃ CO₂ 培养箱中孵育 1min 左右；
- 4) 孵育完成后在倒置显微镜下观察细胞是否变圆飘起，如还有部分细胞未消化下来，可在生物安全柜内用移液管吸起消化液，吹打培养平面；
- 5) 向消化下细胞的培养瓶中加入 3ml 含 10%血清的完全培养基终止消化，然后将培养瓶中的

液体转入 15ml 离心管中，300g 离心 5min；

- 6) 离心完成后，弃上清，用 1mL 冻存液重悬细胞沉淀，然后转入 1.8ml 冻存管中；
- 7) 将冻存管转入填满异丙醇的程序降温盒中，之后转入-80℃冰箱中过夜降温；
- 8) 第二天，取出降温完成的序降温盒中的冻存管，尽快转入液氮罐中保存。



赛百慷（上海）生物技术股份有限公司

注册地址：中国（上海）自由贸易试验区希雅路 11 号 14 号楼 4 楼

办公地址：上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 2 楼

电话：400-021-2021

网址：www.icellbioscience.com